

〔報告〕 分子生物学的手法による高松塚古墳・キトラ古墳 の微生物群集構造解析

西島 美由紀*・安 光得*¹・富田 順子*・喜友名 朝彦*・佐藤 嘉則・
木川 りか²・佐野 千絵・宇田川 滋正**・建石 徹**・杉山 純多***³

1. はじめに

特別史跡高松塚古墳および特別史跡キトラ古墳は、終末期古墳時代（7世紀末期から8世紀初期）に築造され、石室（石槨）内に極彩色（多彩色）の壁画を有することで注目された古墳である。高松塚古墳の壁画は、1972年3月にわが国で初めての極彩色（多彩色）の古墳壁画として発見され、石室内の湿度がほぼ100%RHに近い高湿度環境にて現地保存されていた¹⁾。石室内には発掘当初からカビ等の微生物がすでに侵入している状態が散見されていた¹⁾。特に2001年春に実施された高松塚古墳の石室内部と保存施設をつなぐ取合部と呼ばれる小空間の天井崩落止め工事以降、カビ等が取合部および石室内部に発生・拡大し、さらには石室壁面上にバイオフィーム（菌類、細菌等の微生物の混生体）が出現するなど、石材（凝灰岩切石）・漆喰の脆弱化や生物劣化（カビなどの生物被害）などのために、狭隘かつ高湿度環境での現地保存は困難となり、古墳石室を解体して、石材とともに壁画を修理することが決定された²⁾。2007年4月から、古墳石室の解体作業が開始され、石材・壁画は同年9月までに明日香村内の仮設修理施設に搬送された。取り出された同壁画は仮設修理施設にて修理作業が進められている。なお、同古墳の石室解体にともなう発掘調査の正式報告書が2017年5月、文化庁ほかから刊行されている³⁾。

一方のキトラ古墳壁画は1983年11月、ファイバースコープにより石室内に壁画の存在が確認され、以降数回のカメラ等による観察結果から、壁画の描かれた漆喰には一部すでに石材から浮き上がるなどの劣化が確認されていた⁴⁾。2004年3月から7月にかけて発掘調査が行われるとともに、古墳石室はそのままに、壁画（漆喰面）のみを取り外し、保護することが同年9月決定された。2008年11月には壁画を含む漆喰の取り外しを終え、2010年11月には余白漆喰を含むすべての漆喰面の取り外しが終了した。2009年3月以降、余白漆喰取り外し中の石室内の微生物生育を抑制する目的で間欠的に紫外線照射が実施された⁵⁾。2013年10月には石室は封印され、埋め戻しが行われた⁵⁾。取り外された壁画は空調管理された施設内で保存修理作業が行われ、2016年秋から明日香村内の文化庁キトラ古墳壁画保存管理施設（キトラ古墳壁画体験学習館の「四神の館」）内で保存・公開が行われている。

高松塚古墳・キトラ古墳については2004年から石室および壁画を取り巻く微生物調査を含む種々の調査が行われた。特に劣化原因の一つと考えられた微生物（カビ・酵母・細菌）調査では、高松塚古墳では石室内、解体中の石室石材、墳丘部等の試料から微生物を分離・培養し、微生物の侵入経路の推察や、主要微生物相について調査が行われた^{6,7)}。また、キトラ古墳については石室内および仮設保護覆屋内の微生物調査が行われた^{6,7)}。分離・培養による手法（以降、

* 株式会社テクノスルガ・ラボ, ** 文化庁, *** 株式会社テクノスルガ・ラボ 千葉分室

1：現 株式会社マクロジェン・ジャパン, 2：現 九州国立博物館, 3：現 国立科学博物館

培養法と略)による調査の結果、両古墳にはそれぞれ特徴的なグループの存在が明らかとなっている⁶⁻²²⁾。加えて、採取した試料から直接 DNA を抽出し、培養によらない分子生物学的手法(非培養法)によって試料内に存在する優占微生物の解明を行った。非培養法は、分離・培養が難しい(難培養)微生物の検出が可能であり、培養法のように培地・培養条件によるバイアス(偏り)がないことが特徴である。よって、両方の手法を用いることで劣化原因微生物のより詳細な推定が可能となると期待される。非培養法で解析対象とする試料からの抽出 DNA には、試料由来の各種生物(微生物)の遺伝子が混合して含まれることから、これを分離するためにクローニング法、変性剤濃度勾配電気泳動法(Polymerase Chain Reaction-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis, PCR-DGGE, 以降 DGGE と略す)、次世代シーケンサー(Next Generation Sequencer, 以下 NGS と略す)を用いたアンプリコン解析などが行われる。非培養法の中でも、DGGE による解析は、優占微生物の検出に適しており、微生物相(microbiota)をバンドパターンとして可視化するという特徴を有するため試料間の優占種をパターンの違いとして比較でき、環境中の難培養微生物相の解析を迅速に行う方法として、有効な手段とされてきた²³⁾。

文化財(主に壁画)の生物劣化についての非培養法による諸外国での調査・研究は、スペイン、フランス、イタリアなどヨーロッパでの事例が多いが²⁴⁻³³⁾、アジアではクローニング法による中国敦煌莫高窟の微生物相解析が報告されている³⁴⁾。特に、DGGE を用いた調査・研究については、これまでにスペインの洞窟壁画を中心に報告されており、これらの調査・研究では、同法および培養法による微生物相は、必ずしも一致しないことを明らかにしている²⁴⁻²⁸⁾。このことは、劣化に関与する微生物種をより正確、網羅的に把握するためには培養法のみではなく、非培養法の併用が必要であることを示唆すると考えられる。

本稿では高松塚古墳の菌類相についての DGGE およびクローニング法による解析結果、細菌相についての DGGE による解析、また、非培養法として実施したキトラ古墳の微生物相解析として、DGGE による細菌相解析について報告する。なお、キトラ古墳の非培養法による微生物解析としては、クローニング法による細菌相解析³⁵⁾、および、NGS を用いたアンプリコン解析による網羅的な菌類及び細菌相解析³⁶⁾が報告されている。培養法による両古墳の微生物相解析の結果を含め、これまでの一連の研究成果が Sugiyama らにより2017年、総説としてまとめられている⁷⁾。

2. 試料および方法

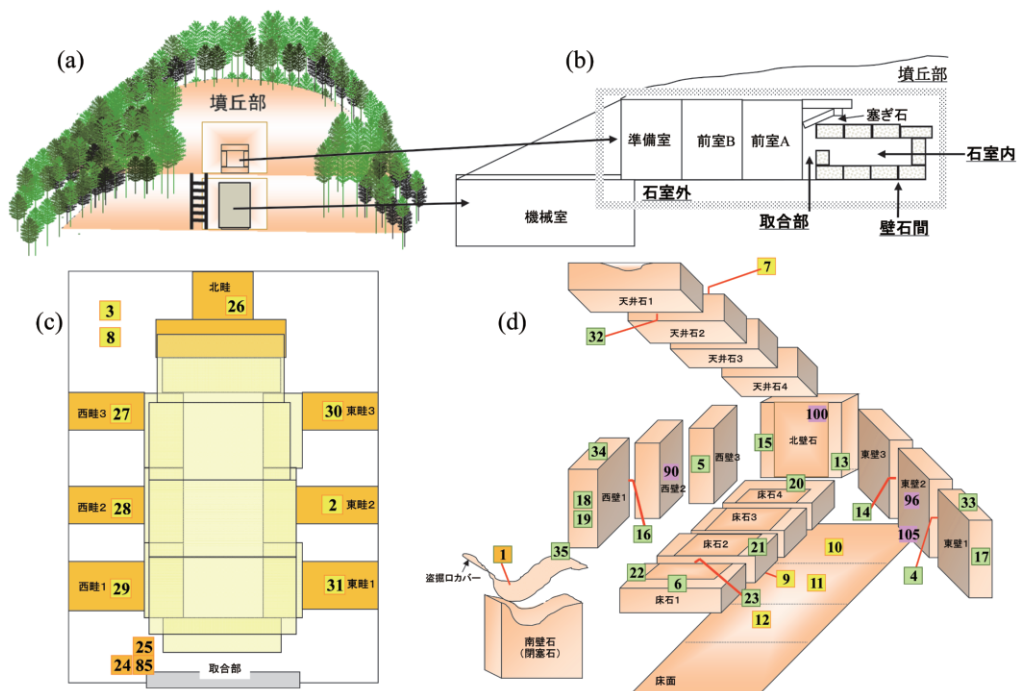
2-1. 供試試料

2-1-1. 高松塚古墳試料

2006年~2009年に採取された高松塚古墳石室内試料および解体期間中の試料(総試料数109点)を細菌優占種解析を目的とした DGGE に用いた(表1)。各試料は、採取場所等によって石室内試料、石室外試料、壁石間試料、取合部試料、墳丘部試料の5つのカテゴリーに分けた(図1)。内訳は古墳石室の漆喰表面など石室内試料(石室解体前、2006年採取)計4点、壁石間試料(側壁間、側壁と床石間、床石間、床石と天井石間など)、石室外試料(畦、側壁と畦間、床面など)、取合部試料などを含む発掘過程の試料(2007年採取分)計91点・墳丘部試料(2006年および2009年採取分)計14点となる。本調査では、古墳は特別史跡、壁画は国宝からのサンプリングであったため、特に石室内の試料は最小限にした。菌類優占種解析を目的とした DGGE には、上述の109試料から計50点を選抜し、クローニング法による解析のためには50点の中からさらに22点を選抜して解析に供した(表3)。図1に DGGE およびクローニング法による解析に

表 1. 非培養法解析に用いた高松塚古墳試料

	採取場所	採取年月	試料数
	(カテゴリー)		
石室解体前	石室内	2006.12	4
	墳丘部 1	2006.7	3
石室解体中・後	壁石間	2007.4-2007.8	36
	取合部	2006.5-2007.5	10
	石室外	2006.7-2007.8	45
	墳丘部 2	2008.8-2009.2	11
		合計	109

図 1 高松塚古墳および石室の概略図 (Sugiyama ら⁷⁾を改変)

(a) 南側からみた古墳全景, (b) 石室の横断面と試料カテゴリー (c) 石室解体後の床面, 甬道の構造, (d) 石室展開図 数字は DGGE の試料採取位置 (表 3)。試料は採取位置に応じて石室内, 取合部, 壁石間, 石室外, 墳丘部のカテゴリーに類別した。

表 2. 非培養法解析に用いたキトラ古墳試料

採取場所	試料・イベント	採取年	試料数
石室内	UV 照射前	2008	8
	UV 照射後	2009	3
	流入土	2004	1
石室外	墳丘部 1	2006	2
	墳丘部 2	2008	1
		合計	15

表3. 菌類 DGGE (図2) および細菌 DGGE (図4、図5) で用いた試料

試料 カテゴリー	試料番号	試料採取位置 図1で の番号	試料及び採取箇所	18S (菌類)		16S (細菌)
				DGGE レーン番号 (図2)	クローニ ング法	DGGEレー ン番号 (図4、図5)
石室内	T61213-2	90	石室内 西壁中央女子 襟部分：ゲル状 (黒色)	1	○	90(図4)
	T61213-8	96	石室内 東壁右女子足元：ゲル	2		96
	T61213-12	100	石室内 北壁天井寄り右上：ゲル	3	○	100
	T61213-17	105	石室内 東壁中央部付近の床上：土	4	○	105
取合部	T7521-8b	1	盗掘口プラスチックカバー 下部：取合部側	5	○	1
	T7214-14k	24	取合部 露出した石室天井 黒色部分 (天井石接触部)	6		24
	T7302-8	25	取合部 西側くぼみの下の土層裏面 黄～緑マット状 バイオフィルム様物質	7	○	25
	T61107-2	85	取合部上部西側穴の近傍 土壌	—		85
石室外	T7409-1	26	北畦 北壁石小口 接触面 (北壁背面土壌黒色部)	8	○	—
	T7302-11	3	北西区 表面土 黒色部分	9	○	—
	T7601-3	2	東壁石2 背後畦内土壌サンプル	10		2
	T7302-10	7	天井石第二石直上 (南区北東隅) 表面の土 黒色～黒褐色	11	○	—
	T7302-12	8	北西区 溝	12		—
	T7821-16	9	床石2 底面 (裏側真ん中付近) の土	13		9
	T7829-1	10	床石4下 (東) 約15cm下 緑色微砂層	14		10
	T7829-2	11	床石3下 (東) 約10cm 淡褐色版築土	15		11
	T7829-3	12	床石2下から10cm下 淡褐色版築土	16		12
	T7426-17	27	西壁石3 西畔 床から5cm土	17		27
	T7601-4	28	西壁石2 背後畦内土壌サンプル	18		28
	T7604-8	29	西壁石1 背後畦内 土壌サンプル	19	○	29
	T7426-18	30	東壁石3 背後畔 側面密着土 黒色	20		30
	T7604-5	31	東壁石1 背後畦内 土壌	21	○	31
壁石間	T7615-9	6	床石 南壁石の下 中央 茶色の土	22		6
	T7607-1	4	東壁石1・2 接合面目地漆喰	23		4
	T7510-7	5	西壁石2 北側小口面 下方東寄り 黒褐色物質 (ゲル状)	24	○	5
	T7521-8a	35	盗掘口プラスチックカバー 下部：石室側	25	○	—
	T7413-6	13	漆喰除去後の北壁と東壁石3との接合下部、黒色物質のついた漆喰片	26		13
	T7517-4	14	東壁石2 北小口 極の黒い部分 (石室側下部)	27	○	14
	T7413-2	15	漆喰除去後の北壁と西壁石3との接合部中央、黒色部	28		15
	T7614-2	16	西壁石1と2の接合面 取外し後の漆喰・土の混合物	29	○	16
	T7615-5	17	東壁石1 南小口 中央部下部 茶色～黒の粘性ゲル	30	○	17
	T7530-16	18	西壁石1 南目地 漆喰天場 黒色粘性 (閉塞石をとめている目地漆喰)	31		18
	T7615-10	19	西壁石1 南小口 右側下部 黒色粘性ゲル	32		19
	T7417-21	20	北壁石 床面との間 漆喰、木の根	33	○	20
	T7607-4	21	東壁石2下 接合面土	34		21
	T7626-14	22	西壁石1 (男子群像) 床石との接触面：底面	35		22
	T7821-7	23	床石1 北小口面 下部左側 赤茶色 粘土 植物根含む	36		23
	T7528-25	32	天井石1 北側面 茶色漆喰片	37		32
	T7530-2	33	東壁石1 上端 天井石1との接合面 漆喰根入り	38		33
	T7530-12	34	西壁石1 上端 天井石1との接合面 漆喰	39		34
墳丘部1	T6202-1	—	石室西脇土壌	—		1 (図5)
	T6202-2	—	石室東脇土壌	—		2
	T6203-4	—	竹藪5cm土壌	—		3
墳丘部2	T8804-4	—	保存施設 東側 旧発掘区 上面 粘土質土壌	40		1 (図5)
	T81027-1	—	墳丘南東斜面オリジナル土 (上層の版築) 土壌	41		2
	T81027-2	—	古墳周辺東側の地山 土壌	42		3
	T81028	—	古墳周辺北側の地山 土壌	43		4
	T81119-1	—	保存施設 東堀形内 埋土	44		5
	T81119-2	—	保存施設 西側堀形 埋土	45	○	6
	T81203-2	—	西側 墳丘土 オリジナル (版築)	46		7
	T81203-3	—	東側 墳丘土 オリジナル 白色版築土 (取合部凝灰岩の裏)	47	○	8
	T81203-5	—	墓道 東側 オリジナル盛土 (版築の上方) (取合部から南に2m)	48	○	9
	T81203-9	—	西 凝灰岩 取合部の壁	49	○	10
	T9217	—	墳丘南西斜面 断割内版築 土壌	50	○	11

用いた高松塚古墳試料採取地点を示した。

2-1-2. キトラ古墳試料

細菌相解析を目的として DGGE を実施するために2004年から2009年までに採取した石室内外の試料, 合計15検体を用いた。このうち1試料は石室内への流入土であり, また, 3試料は墳丘部などの土壌試料である。残り11試料は石室内で採取され, その中の8試料はUV照射前のものである(表2)。なお, キトラ古墳試料について, 菌類群集の優占種解析のための非培養法による試験は本稿の試料では行っていない。

2-2. 方法

2-2-1. DNA抽出からPCR

両古墳に由来する全ての対象試料からのDNA抽出には, ISOIL for Beads Beating (ニッポンジーン)を用い, 付属の手順書に従ってDNAを抽出した。得られたDNA抽出物を用いて細菌および菌類の種組成(優占種)を明らかにするためにリボソームRNA(以降rRNAと表記)遺伝子小サブユニット(細菌は16S rRNA 遺伝子(以下16Sと略記), 菌類は18S rRNA 遺伝子(以下18Sと略記))の部分塩基配列を増幅した。なお, 菌類の18S増幅用として用いたプライマーは, 後述するクローニング法で用いるプライマーも含めて菌類以外の真核生物の18Sも増幅可能である。PCR増幅用プライマーは16Sを対象としたDGGEではGC-341f³⁷⁾-534r³⁷⁾を, 18Sには1427f³⁸⁾-GC clamp-1616r³⁸⁾を用いた(表4)。16S, 18SともPCR増幅産物としてはおよそ200塩基の増幅断片長が期待される。PCR反応液は0.25 μLのプライマーセット(各25pmol), 2.5 μLのdNTP mixture(各2mM), 2.5 μLの10×PCR Gold buffer, 3 μLの20mM MgCl₂, 0.25 μLのAmpliTaq Gold® DNA Polymerase (Applied Biosystems), 1 μLの抽出DNA(鋳型DNA)(およそ20ng)に滅菌milliQ水を15.25 μL加えて最終量25 μLになるように調製した。PCR装置はGeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems)を用いた。PCRの反応条件は, Muyzer ら³⁷⁾のTouch Down法に従った。すなわち, 94°C, 7分で酵素を活性化し, 引き続き94°Cで1分(熱変性), 65°Cから56°Cへ2サイクルごとに1°C下げ

表4. 試験に用いたプライマー

プライマー	塩基配列 (5' → 3')	文献
菌類 DGGE 用		
1427f-GC clamp*	<u>CGCCCGCCGCGCCCCGCGCCCGCCCGCCGCC</u> <u>CGCCCCTCTGTGATGCCCTTAGATGTTCTGGG</u>	Van Hannen ら ³⁸⁾
1616r	GCGGTGTGTACAAAGGGCAGGG	
菌類クローニング用		
Fung-f	CAACGGGTAACGGGGAAT	May ら ³⁹⁾ を改変
1427r	CCCAGAACATCTAAGGGCATCACAGA	Van Hannen ら ³⁸⁾
細菌 DGGE 用		
GC-341f*	<u>CGCCCGCCGCGCGGGCGGGCGGGGCGGGGGCA</u> <u>CGGGGGGCCTACGGGAGGCAGCAG</u>	Muyzer ら ³⁷⁾
534r	ATTACCGCGGCTGCTGG	

*: プライマー配列の下線部分は DGGE 用の GC クランプと呼ばれる配列。

DGGE ゲルからのシーケンスには GC クランプの無いプライマーを使用

ながらアニーリング反応を行い、72°C で2分の伸長反応を行った(熱変性、アニーリング反応、伸長反応の一連を1サイクルとして合計20サイクル)。このあと、94°Cで1分、55°Cで1分、72°Cで2分のサイクルを15サイクル実施し、最後に72°Cで10分の伸長反応を行った。PCR増幅産物は2%アガロースゲルを用いたアガロースゲル電気泳動により、期待された塩基長のDNA断片が増幅されているかどうかを確認した。

2-2-2. 変性剤濃度勾配電気泳動法 (DGGE)

得られたPCR増幅産物はDcode DGGE コンプリートシステム (BIO RAD) を用いた変性剤濃度勾配電気泳動を行った。電気泳動用ゲルの変性剤濃度勾配は40%ホルムアミドと7 M 尿素の混合液を100%とする変性剤の濃度を25%~65%の濃度勾配とし、8%ポリアクリルアミドゲル(アクリルアミドHG(和光純薬)とビスアクリルアミド(和光純薬)の混合比は37.5:1)を用いた。電気泳動は16SのPCR増幅産物は60°C、電圧100V、12時間、18SのPCR増幅産物は60°C、50Vで20時間行った。電気泳動終了後、アクリルアミドゲルを1万倍希釈したサイバークリーン (SYBR Green I nucleic acid gel stain, Lonza Rockland) で染色し、UVトランスイルミネーターでDNA断片をバンドとして確認するとともにCCDカメラでゲル画像の撮影を行った。確認された各DNA断片(各バンド)をゲルから切り出し、ゲル中に含まれるDNAを溶出、精製した。切り出した各バンドには、目的以外の複数の塩基配列が含まれる可能性があるため、PCRからDGGE操作を繰り返し行い、目的の塩基配列のみが変性剤濃度勾配ゲル上で単一のバンドになるまで純化作業を行った。

2-2-3. DGGE バンドの塩基配列解析

単一の塩基配列を含む各バンドから抽出したDNAを用いて、塩基配列解析を行った。塩基配列解析のためのシーケンス反応はBigDye Terminator Cycle Sequencing Kit v3.1 (Applied Biosystems)を使用し表4に示すDGGE用プライマーのGCクランプ部分を除いた配列を用いた。シーケンスはABI 3130xl Genetic Analyzer System (Applied Biosystems)を用いた。得られた塩基配列はChromasPro 1.4 (Technelysium Pty)を用い、配列を決定した。

2-2-4. 菌類18Sのクローニング解析

菌類18Sのクローニング法解析には、選抜した22試料からの抽出DNAを用いた。各試料抽出DNAからMayらのプライマー³⁹⁾を改変したFung-fと1427r³⁸⁾のプライマーセット(表4)によるPCRを行って増幅産物を得た。クローニングはTOPO TA Cloning Kit (Invitrogen - Molecular Probes)を用い、各クローンからBigDye Terminator Cycle Sequencing Kit v3.1およびABI3130xl DNA sequencerで塩基配列を取得した。

2-2-5. 相同性検索および分子系統解析

DGGEおよびクローニング法による解析から得られた16Sあるいは18Sの塩基配列を用い、決定したバンドあるいはクローンの各生物由来DNA塩基配列の近縁種を推定するために国際塩基配列データベース (DDBJ/ENA/NCBI) に対してBLAST⁴⁰⁾による相同性検索を行った。さらに、クローニングで得られた菌類由来の配列については、国際塩基配列データベースから入手した塩基配列を加えたデータセットを用いて分子系統解析を行った。分子系統解析にはMEGA ver4.0⁴¹⁾を用いてアライメントおよび系統樹を作成した。これらの結果を基に、各塩基配列が由来する微生物の帰属分類群を推定した。なお、菌類高次分類群の分類体系については

Kirk ら (2008)⁴²⁾, 細菌の高次分類群については J. P. Euzéby (1997; <http://www.bacterio.net/index.html>) の “List of Prokaryotic Names withstanding in Nomenclature (LPSN)”, に従った。なお, 細菌の門レベル等の非合法学名は, 本文中では引用符(“ ”)を付けて表記し, 図5・表7・表8中では便宜的に省いた。

決定した塩基配列は国際塩基配列データベース (DDBJ/ENA/NCBI) に登録した。各配列のアクセッション番号は以下の通りである。DGGE バンド由来配列: LC364478~LC365102、クローン配列: LC365103~LC365280。

3. 結果および考察

3-1. 高松塚古墳微生物相の優占種解析

3-1-1. 高松塚古墳の菌類相

菌類 (18S) の DGGE 用に選択した50点の試料 (表3) の DGGE ゲルのバンドパターンを図2に示した。各バンドは微生物種の DNA 塩基配列に由来することから, パターンの相違は優占微生物が試料間で相違することを意味する。試料によってパターンに違いが認められるが, 石室外や壁石間などの試料では, 主なバンドパターンが類似する試料があった。切り出した129本のバンドについて, それが由来する生物の塩基配列解析を行い, 生物種の推定を行った。その結果, 石室内では Saccharomycetales 目菌類に由来するバンドが優占種として確認された (表

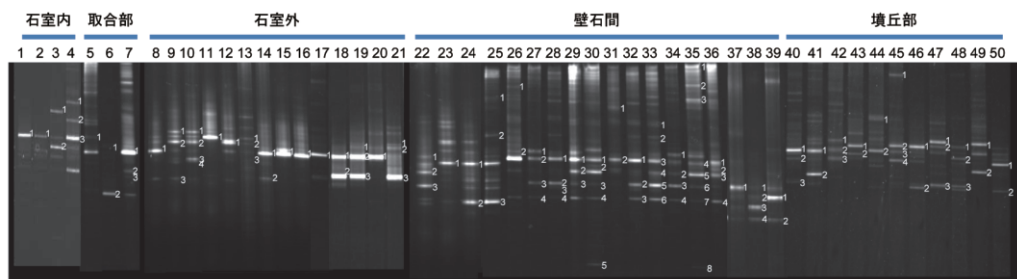


図2 高松塚古墳試料の18S rRNA 遺伝子増幅産物による DGGE バンドパターン
レーンの数字は1~50までの通し番号で試料を表示した。図1で示す採取位置との関係は表3を参照のこと。1~4, 石室内, 5~7, 取合部, 8~21, 石室外, 22~39, 壁石間, 40~50, 墳丘部からの採取試料。バンド横の数字は塩基配列を実施したもの (表5)。

表5. 高松塚古墳試料 菌類 DGGE 解析によるバンドが由来する生物種塩基配列の近縁種

試料カテゴリー	DGGE バンド名*1	近縁生物種	分類階層	近縁配列アクセッション番号	相同率 (%)	比較塩基数*2
石室内	1-2	Uncultured eukaryote isolate TGGE band 11	Ascomycota; Saccharomycetales	AY736096	100	211/211
	2-1	<i>Candida parapsilosis</i> strain NRRL Y-12969	Ascomycota; Saccharomycetales	FJ153126	98	207/211
	3-1	<i>Orbilia fimicola</i>	Ascomycota; Orbiliales	AF006307	100	211/211
	3-2	<i>Candida boidinii</i> strain NRRL Y-2332	Ascomycota; Saccharomycetales	EU011678	99	210/211
	4-1	Uncultured eukaryote isolate TGGE band 11	Ascomycota; Saccharomycetales	AY736096	98	185/187
	4-2	Uncultured eukaryote isolate TGGE band 11	Ascomycota; Saccharomycetales	AY736096	99	209/211
	4-7	<i>Aspergillus terreus</i> isolate Li-20	Ascomycota; Eurotiales	GU573850	100	210/210
取合部	5-1	<i>Chaetomium elatum</i> strain T53	Ascomycota; Sordariales	FN666095	98	203/206
	6-1	<i>Aspergillus terreus</i> isolate Li-20	Ascomycota; Eurotiales	GU573850	100	210/210
	6-2	<i>Phialocephala fortinii</i> strain UAMH 9525	Ascomycota; Helotiales	AY524846	100	205/205
	7-1	<i>Phialocephala fortinii</i> strain UAMH 9525	Ascomycota; Helotiales	AY524846	100	205/205
	7-2	<i>Sphaeronaemella fragariae</i>	Ascomycota; Microascales	AY271802	99	207/208
	7-3	Uncultured ascomycete clone IMRP106	Ascomycota; Incertae sedis	AY343925	97	195/200
	8-1	Uncultured fungus clone T3_IV_1a_11	Ascomycota; Hypocreales	EF628547	99	210/211

石室外	9-1	<i>Mortierella</i> sp. CO-21	Zygomycota; Mortierellales	AB521052	99	212/213
	9-2	<i>Exophiala salmonis</i> isolate AFTOL-ID 671	Ascomycota; Chaetothyriales	EF413608	99	212/213
	9-3	<i>Tullbergia yosii</i> voucher SIE C040004	Eukaryote; Collembola	DQ016556	99	209/210
	10-1	<i>Candida parapsilosis</i> strain NRRL Y-12969	Ascomycota; Saccharomycetales	FJ153126	97	207/212
	10-2	<i>Exophiala salmonis</i> isolate AFTOL-ID 671	Ascomycota; Chaetothyriales	EF413608	99	212/213
	10-3	<i>Verticillium dahliae</i>	Ascomycota; Hypocreomycetidae	AF104926	99	210/211
	10-4	<i>Penicillium allii</i>	Ascomycota; Eurotiales	AF218787	99	213/214
	11-1	<i>Phialocephala fortinii</i> strain UAMH 9525	Ascomycota; Helotiales	AY524846	99	211/212
	12-1	<i>Exophiala salmonis</i> isolate AFTOL-ID 671	Ascomycota; Chaetothyriales	EF413608	99	212/213
	13-1	<i>Tullbergia yosii</i> voucher SIE C040004	Eukaryote; Collembola	DQ016556	100	209/209
	13-2	Mortierellaceae sp. LN07-7-4	Zygomycota; Mortierellales	EU688964	99	213/214
	13-3	<i>Phialocephala fortinii</i> strain UAMH 9525	Ascomycota; Helotiales	AY524846	99	211/212
	14-1	<i>Calcarisporium arbuscula</i>	Ascomycota; Hypocreales	AY271796	99	209/211
	14-2	<i>Aspergillus terreus</i> isolate Li-20	Ascomycota; Eurotiales	GU573850	100	212/212
	15-1	<i>Calcarisporium arbuscula</i>	Ascomycota; Hypocreales	AY271796	99	209/211
	16-1	Uncultured <i>Neonectria</i> clone LTSP_EUKA_P4J14	Ascomycota; Hypocreales	FJ553819	100	178/178
	17-1	Uncultured fungus clone T3_IV_1a_11	Ascomycota; Hypocreales	EF628547	100	206/206
	18-1	Uncultured fungus clone T3_IV_1a_11	Ascomycota; Hypocreales	EF628547	100	207/207
	18-2	<i>Aspergillus terreus</i> isolate Li-20	Ascomycota; Eurotiales	GU573850	100	210/210
	19-1	Uncultured fungus clone f	Ascomycota; Incertae sedis	DQ027902	100	210/210
	19-2	Uncultured fungus clone T3_IV_1a_11	Ascomycota; Hypocreales	EF628547	100	207/207
19-3	<i>Aspergillus terreus</i> isolate Li-20	Ascomycota; Eurotiales	GU573850	100	209/209	
20-1	Uncultured fungus clone T3_IV_1a_11	Ascomycota; Hypocreales	EF628547	100	209/209	
21-1	<i>Chalara aurea</i>	Ascomycota; Incertae sedis	AF222503	100	210/210	
21-2	Uncultured fungus clone f	Ascomycota; Incertae sedis	DQ027902	100	212/212	
21-3	<i>Aspergillus terreus</i> isolate Li-20	Ascomycota; Eurotiales	GU573850	100	196/196	
壁石間	22-1	<i>Claviceps purpurea</i> strain: MAFF 240419	Ascomycota; Hypocreales	AB490177	97	206/211
	22-2	<i>Auricularia auricula-judae</i> AFTOL-ID 1681	Basidiomycota; Auriculariales	DQ520099	98	210/214
	22-3	<i>Tullbergia yosii</i> voucher SIE C040004	Eukaryote; Collembola	DQ016556	99	209/210
	23-1	<i>Chaetomium elatum</i> strain T53	Ascomycota; Sordariales	FN666095	99	208/209
	24-1	<i>Chaetomium elatum</i> strain T53	Ascomycota; Sordariales	FN666095	99	208/209
	24-2	<i>Trichocoma paradoxa</i> isolate CBS 788.83	Ascomycota; Eurotiales	FJ358354	99	212/213
	25-1	<i>Ostropa barbara</i> isolate AFTOL-ID 77	Ascomycota; Ostropales	AY584666	98	194/197
	25-2	Uncultured eukaryote isolate TGGE band 11	Ascomycota; Saccharomycetales	AY736096	100	210/210
	25-3	<i>Trichocoma paradoxa</i> isolate CBS 788.83	Ascomycota; Eurotiales	FJ358354	100	206/206
	26-1	<i>Aphelenchoides</i> sp. US01	Eukaryote; Nematoda	GU337998	99	207/208
	26-2	<i>Mortierella</i> sp. CO-21	Zygomycota; Mortierellales	AB521052	100	210/210
	27-1	<i>Mortierella</i> sp. CO-21	Zygomycota; Mortierellales	AB521052	100	198/198
	27-2	<i>Exophiala salmonis</i> isolate AFTOL-ID 671	Ascomycota; Chaetothyriales	EF413608	100	198/198
	27-3	<i>Verticillium dahliae</i>	Ascomycota; Hypocreomycetidae	AF104926	100	207/207
	27-4	<i>Tullbergia yosii</i> voucher SIE C040004	Eukaryote; Collembola	DQ016556	100	207/207
	28-1	<i>Exophiala salmonis</i> isolate AFTOL-ID 671	Ascomycota; Chaetothyriales	EF413608	100	212/212
	28-2	<i>Verticillium dahliae</i>	Ascomycota; Hypocreomycetidae	AF104926	100	209/209
	28-3	<i>Verticillium dahliae</i>	Ascomycota; Hypocreomycetidae	AF104926	99	207/208
	28-4	<i>Tullbergia yosii</i> voucher SIE C040004	Eukaryote; Collembola	DQ016556	100	206/206
	29-1	<i>Exophiala salmonis</i> isolate AFTOL-ID 671	Ascomycota; Chaetothyriales	EF413608	100	210/210
	29-2	<i>Fusarium</i> sp. MBS1	Ascomycota; Hypocreales	FJ613599	100	207/207
	29-3	<i>Verticillium dahliae</i>	Ascomycota; Hypocreomycetidae	AF104926	100	208/208
	30-1	<i>Exophiala salmonis</i> isolate AFTOL-ID 671	Ascomycota; Chaetothyriales	EF413608	100	210/210
	30-2	<i>Hohenbuehelia tristis</i> strain RV95/214	Basidiomycota; Agaricales	DQ851573	100	205/205
	30-3	<i>Verticillium dahliae</i>	Ascomycota; Hypocreomycetidae	AF104926	100	206/206
	30-4	<i>Tullbergia yosii</i> voucher SIE C040004	Eukaryote; Collembola	DQ016556	100	204/204
	30-5	Uncultured organism clone Cluster1069	Ascomycota; Incertae sedis	GU178359	98	197/200
	31-1	<i>Rhizoplaca chrysoleuca</i> strain 111	Ascomycota; Lecanorales	AY530883	91	246/270
	31-2	<i>Exophiala salmonis</i> isolate AFTOL-ID 671	Ascomycota; Chaetothyriales	EF413608	100	210/210
	32-1	<i>Exophiala salmonis</i> isolate AFTOL-ID 671	Ascomycota; Chaetothyriales	EF413608	100	211/211
	32-2	<i>Verticillium dahliae</i>	Ascomycota; Hypocreomycetidae	AF104926	100	209/209
	32-3	<i>Tullbergia yosii</i> voucher SIE C040004	Eukaryote; Collembola	DQ016556	100	206/206
	33-1	<i>Exophiala salmonis</i> isolate AFTOL-ID 671	Ascomycota; Chaetothyriales	EF413608	100	209/209
	33-2	<i>Verticillium dahliae</i>	Ascomycota; Hypocreomycetidae	AF104926	100	209/209
	33-3	<i>Exophiala salmonis</i> isolate AFTOL-ID 671	Ascomycota; Chaetothyriales	EF413608	100	210/210
	33-4	Fungal sp. FCAS133	Ascomycota; Hypocreales	GQ120161	100	207/207
33-5	<i>Verticillium dahliae</i>	Ascomycota; Hypocreomycetidae	AF104926	100	209/209	
33-6	<i>Tullbergia yosii</i> voucher SIE C040004	Eukaryote; Collembola	DQ016556	100	207/207	

34-1	<i>Mortierella</i> sp. CO-21	Zygomycota; Mortierellales	AB521052	100	210/210
34-2	<i>Fusarium</i> sp. MBS1	Ascomycota; Hypocreales	FJ613599	100	208/208
34-3	<i>Auricularia auricula-judae</i> AFTOL-ID 1681	Basidiomycota; Auriculariales	DQ520099	99	207/209
34-4	<i>Tullbergia yosii</i> voucher SIE C040004	Eukaryote; Collembola	DQ016556	100	207/207
35-1	<i>Septofusidium herbarum</i> strain CBS 265.58	Ascomycota; Hypocreales	AY526480	99	99/100
35-2	<i>Desmodemus communis</i>	Eukaryote; Chlorophyta	X73994	88	189/214
35-3	<i>Aplanochytrium</i> sp. S1a	Stramenopiles; Labyrinthulida	FJ810216	99	210/211
35-4	<i>Exophiala salmonis</i> isolate AFTOL-ID 671	Ascomycota; Chaetothyriales	EF413608	100	209/209
35-5	Uncultured fungus clone T3_IV_1a_11	Ascomycota; Hypocreales	EF628547	100	208/208
35-6	<i>Verticillium dahliae</i>	Ascomycota; Hypocreomycetidae	AF104926	100	206/206
35-7	<i>Tullbergia yosii</i> voucher SIE C040004	Eukaryote; Collembola	DQ016556	99	164/165
35-8	Uncultured organism clone Cluster1069	Ascomycota; Incertae sedis	GU178359	98	197/200
36-1	<i>Fusarium</i> sp. 94a	Ascomycota; Hypocreales	AJ557797	99	205/207
36-2	<i>Hohenbuehelia tristic</i> strain RV95/214	Basidiomycota; Agaricales	DQ851573	100	206/206
36-3	Uncultured fungus clone T3_IV_1a_11	Ascomycota; Hypocreales	EF628547	100	206/206
36-4	<i>Tullbergia yosii</i> voucher SIE C040004	Eukaryote; Collembola	DQ016556	100	207/207
37-1	<i>Exophiala salmonis</i> isolate AFTOL-ID 671	Ascomycota; Chaetothyriales	EF413608	100	161/161
38-1	<i>Verticillium dahliae</i>	Ascomycota; Hypocreomycetidae	AF104926	100	209/209
38-2	<i>Tullbergia yosii</i> voucher SIE C040004	Eukaryote; Collembola	DQ016556	100	205/205
38-3	<i>Exophiala salmonis</i> isolate AFTOL-ID 671	Ascomycota; Chaetothyriales	EF413608	100	209/209
38-4	<i>Tullbergia yosii</i> voucher SIE C040004	Eukaryote; Collembola	DQ016556	100	207/207
39-1	Uncultured fungus clone T3_IV_1a_11	Ascomycota; Hypocreales	EF628547	100	207/207
39-2	<i>Tullbergia yosii</i> voucher SIE C040004	Eukaryote; Collembola	DQ016556	100	205/205
墳丘部	40-1 <i>Thermomyces lanuginosus</i> strain ATCC 200065	Ascomycota; Eurotiales	EF468714	97	202/208
	40-2 <i>Pestalotiopsis guepinii</i> strain WR-1	Ascomycota; Xylariales	EU375526	94	199/210
	40-3 <i>Pestalotiopsis guepinii</i> strain WR-1	Ascomycota; Xylariales	EU375526	98	207/210
	41-1 <i>Thermomyces lanuginosus</i> strain ATCC 200065	Ascomycota; Eurotiales	EF468714	97	207/213
	41-2 <i>Kavinia himantia</i>	Basidiomycota; Gomphales	AY293138	99	212/213
	42-1 <i>Arachnula impatiens</i> strain Baikala155	Eukaryote; Cercozoa	EU567294	92	196/211
	42-2 <i>Thermomyces lanuginosus</i> strain ATCC 200065	Ascomycota; Eurotiales	EF468714	97	206/212
	42-3 <i>Hypocrea koningii</i> strain JH	Ascomycota; Hypocreales	EU722404	96	200/208
	43-1 <i>Craterellus tubaeformis</i> isolate OSC 49915	Basidiomycota; Cantharellales	DQ898683	98	207/211
	43-2 <i>Trichaptum abietinum</i>	Basidiomycota; Polyporales	AF026585	97	171/175
	44-1 Uncultured Soil Clone Group I clone N18	Ascomycota; Incertae sedis	EU179935	97	183/188
	44-2 Uncultured soil fungus clone CK173	Ascomycota; Incertae sedis	GU568140	87	147/168
	45-1 Uncultured cercozoan isolate HetAus17	Eukaryote; Cercozoa	EU709266	97	172/176
	45-2 <i>Herpotrichia juniperi</i> isolate AFTOL-ID 1608	Ascomycota; Pleosporales	DQ678029	99	174/175
	45-3 <i>Thermomyces lanuginosus</i> strain ATCC 200065	Ascomycota; Eurotiales	EF468714	99	175/176
	45-4 Uncultured fungus clone T3_IV_1a_11	Ascomycota; Hypocreales	EF628547	98	172/174
	46-1 Uncultured fungus isolate DGGE band M1-23-5-89	Ascomycota; Incertae sedis	DQ520023	99	175/176
	46-2 <i>Phialosimplex caninus</i> strain UAMH 10335	Ascomycota; Eurotiales	GQ169312	98	209/212
	47-1 <i>Phialea strobilina</i> strain CBS 643.85	Ascomycota; Incertae sedis	EF596821	97	206/212
	47-2 <i>Loramycetes macrosporus</i> isolate AFTOL-ID 913	Ascomycota; Helotiales	DQ471005	98	208/211
	47-3 <i>Penicillium decumbens</i> isolate K1	Ascomycota; Eurotiales	GU573852	100	212/212
	48-1 <i>Candida lactis-condensii</i>	Ascomycota; Saccharomycetales	AB018144	94	199/211
	48-2 <i>Malassezia obtusa</i>	Basidiomycota; Malasseziales	EU192365	89	155/173
	48-4 <i>Penicillium decumbens</i> isolate K1	Ascomycota; Eurotiales	GU573852	100	212/212
	49-1 <i>Scytalidium lignicola</i> strain UAMH 1502	Ascomycota; Helotiales	AY762623	100	212/212
	49-2 <i>Penicillium</i> sp. LAC1	Ascomycota; Eurotiales	FN666097	98	204/207
	50-1 Uncultured fungus clone T3_IV_1a_11	Ascomycota; Hypocreales	EF628547	100	210/210
	50-2 <i>Aspergillus alliaceus</i> strain SHIA 1572	Ascomycota; Eurotiales	EU278606	97	207/213

* 1 : バンド名の最初の数字は表 3 および図 2 の 18S (菌類) DGGE ゲル電気泳動像の試料番号、枝番は図 2 のゲル上に記載の各バンドの数字を意味する

* 2 : 比較塩基数の分子は DGGE バンドからの取得塩基配列の塩基数、分母は近縁種当該領域の塩基数

5)。Helotiales 目は墳丘部と取合部から検出された。Hypocreales 目は墳丘部、石室外、取合部、壁石間など広い範囲で検出された。特に、壁石間の試料は検出されたバンドの数がほかの試料と比べて多く、切り出したバンドからは様々な菌類に由来する塩基配列が確認された。取り合い部や石室外の試料の一部からは *Phialocephala* 属に由来するバンドが確認された。また、石室外、壁石間の試料の優占種としては *Exophiala* 属に由来するバンドが確認された。培養法で

は *Phialocephara* 属は石室内および取り合い部から分離されており、非培養法の結果と合わせて考えると石室外から石室内へ侵入したことが推察される。*Exophiala* 属は培養法では墳丘部土壌から分離されているが、非培養法の結果からは少なくとも石室の壁石間までは侵入していたものと考えられた。

解析を行った129バンドに由来する生物群は培養法の結果⁷⁾と同じく子囊菌門が優勢し、担子菌門、接合菌門に由来するバンドも認められた。さらに、節足動物門のトビムシ(トビムシ目)、や線虫(線形動物門)など菌類以外の生物に由来するバンドも確認された。

18Sによるクローン解析は50点の試料のうち、22点を用いて行った(表3)。得られた1201クローンの塩基配列解析は、大きく88の分類群に分けられ、*Exophiala*・*Phialocephara*・*Pichia* が上位3属として検出された(表6)。なかでも *Exophiala* 属は壁石間試料で、*Phialocephara* 属は石室外試料で、*Pichia* 属酵母は石室内試料で最優勢種として検出されており、DGGEの結果を支持した(表6)。得られた塩基配列による分子系統解析の結果から、Eurotiales目およびHelotiales目がすべての採取箇所から検出された(図3)。Chaetothyriales目は墳丘部と石室内では検出されなかった。また、DGGEで検出された *Fusarium* 属を含む Hypocreales目はクローン解析では検出されず、非培養法でも手法によって違いが認められた。クローン解析の結果でも壁石間と石室外の試料からは、DGGEの結果と同様に節足動物のトビムシが多く検出された。トビムシは石室内の小動物として目視でも確認された生物であり、このほかに石室壁面にはダニなども存在したことが観察されている⁷⁾。18S塩基配列領域を増幅した際にトビムシが

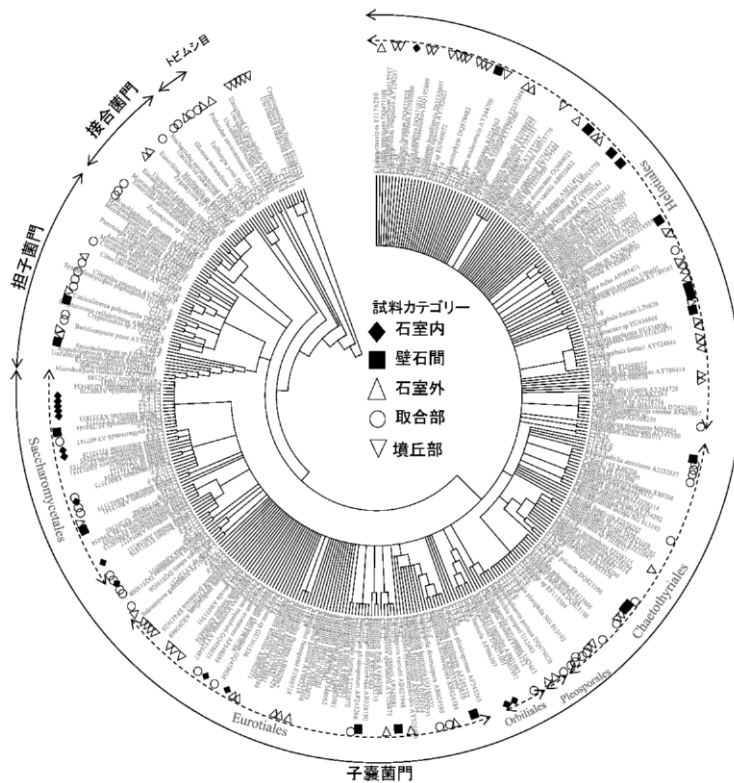


図3 高松塚古墳試料のクローニング法により得られた18S rDNA 遺伝子塩基配列の分子系統的位置。各クローンが得られた試料の categorie を示した。菌類高次分類群の分類体系については Kirk ら⁴²⁾によった。

検出されたのに対し、ダニが検出されなかったことについては、用いたプライマーがダニの18Sと合わなかったことも考えられる。

非培養法によって検出された菌類は、石室内あるいは解体試料から分離された株と一致するものが多く認められた。このことは、石室内で検出された菌類は石室の周辺環境から侵入してきた可能性を示唆するといえる。加えて非培養法でも検出されたトビムシは、菌類の“運び屋” (“vector”) であることが報告され⁴³⁾、また *Acremonium*・*Beauveria*・*Cladosporium*・*Gliocladium*・*Oidiodendron*・*Penicillium*・*Verticillium* 各属など石室あるいは解体試料から分離・検出された多くの菌類がトビムシからも分離されている⁴⁴⁾。さらに、ラスコー遺跡においても、トビムシが関与して微生物が伝搬した可能性があること^{45, 46)}、高松塚古墳で優占種として分離された *Stenotrophomonas* 属細菌¹⁷⁾と近縁な細菌がトビムシ腸内から分離されている^{7, 47)} ことなど、このような節足動物が微生物の伝搬に重要な役割を果たしていることが示唆されている。従って、高松塚古墳石室内においても、ダニやトビムシなどが劣化原因微生物の侵入、伝搬に寄与した可能性が高い⁷⁾。

解体試料の解析結果から、壁石間ではほかの試料に比べて多様な菌類が存在したことが非培養法でも確認された。このことから、菌類の生息環境として壁石間は石室外や墳丘部などの石室外環境と、石室内との境界であったと考えられ、何百年もの間、両方の環境からの多様な微生物種の蓄積がなされる場所となっていたのではないかと推察された。

3-1-2. 高松塚古墳の細菌相

図4に石室内、壁石間、石室外、取合部試料における DGGE のバンドパターンを示す。図4における4種類の矢印は、それぞれ石室内試料の主要な細菌分離株である *Ochrobactrum*・

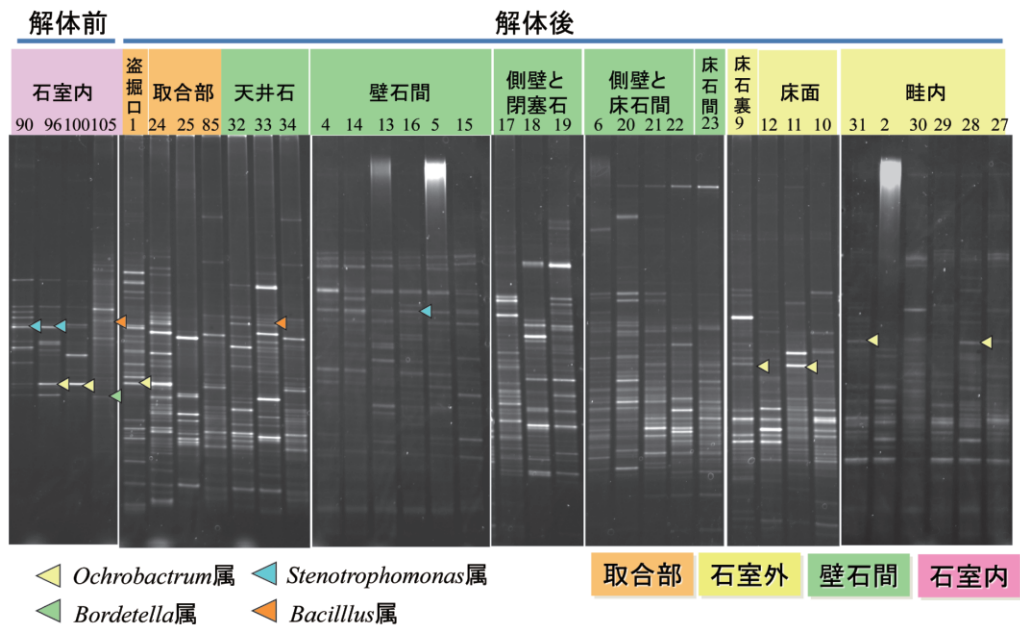


図4 高松塚古墳試料による16S rRNA 遺伝子増幅産物による DGGE バンドパターン解析に用いた109試料のうち、菌類で用いたものとはほぼ同様の試料のバンドパターンを試料カテゴリごとに示した。試料採取部位については図1および表3を参照のこと、各レーン番号は図1の試料番号を示す。石室内の細菌主要分離株が帰属する4つの属について出現バンドを表示した。

Stenotrophomonas・*Bordetella*・*Bacillus* 各属が検出されたバンドを示す。石室内試料の DGGE バンドパターンは、壁石間、石室外、取合部試料と比べてバンド数が少ない。このことから、石室内試料の細菌相は特定の優占種で構成されていると推察された。バンドの塩基配列解析より石室内試料から検出された *Ochrobactrum*・*Stenotrophomonas*・*Bordetella* 各属は、高松塚古墳石室解体試料の培養法による調査でも検出されており^{16, 17, 19)}、さらに、バンドとして得られた塩基配列は培養法で同定された菌種のものとも一致したことから(表7)、これらの細菌が石室内において優占種であるとの結果を非培養法でも支持するものと考えられた。*Bordetella* 属由来のバンドは、石室内試料でのみ検出され、培養法の結果と一致した^{7, 16)}。

図5に高松塚古墳墳丘部試料における DGGE による解析結果を示す。図5における4種類の矢印は、それぞれ *Bacillus* 属、*Gluconacetobacter* 属、“*Acidobacteria*”門、“*Actinobacteria*”門が検出されたバンドを示す。解体前(2006年)および解体後(2008年)の墳丘部試料では、DGGE バンドパターンに相違が認められた(図5)。さらに、解体前(2006年)の墳丘部試料では、*Bacillus* 属が優占する試料(図5, レーン1)、“*Acidobacteria*”門および“*Actinobacteria*”門が優占する試料(図5, レーン2)、“*Acidobacteria*”門および *Gluconacetobacter* 属が優占する試料(図5, レーン3)というように試料間において、優占種が異なっていたが、解体後(2008年)の墳丘部試料では、広範囲で採取されたにも関わらず大部分の試料において“*Acidobacteria*”門および“*Actinobacteria*”門が共通する優占種として検出された。バンドの主な塩基配列の相同性検索結果を表7に示した。培養法では墳丘部試料からは放線菌や *Bacillus* 属細菌が多く分離され、DGGE の結果を支持するものと考えられるが、一方で、“*Acidobacteria*”門および“*Chloroflexi*”門など培養困難な細菌として知られる塩基配列も DGGE では多く検出されていた。

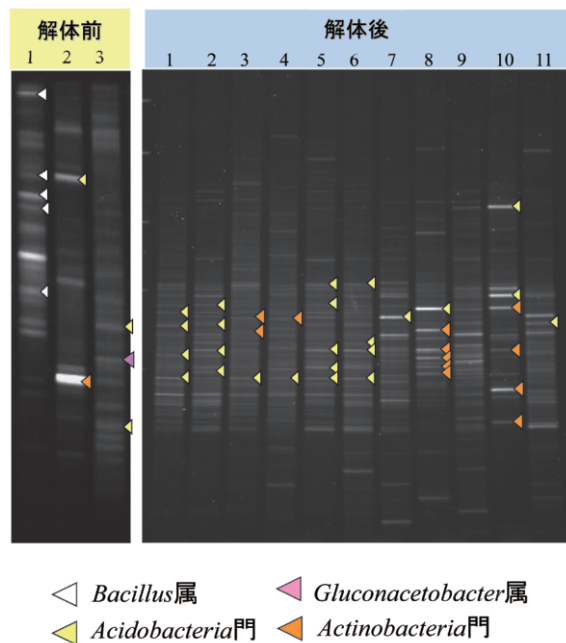


図5 高松塚古墳墳丘部試料の16S rRNA 遺伝子増幅産物による DGGE バンドパターン
石室解体前(発掘調査前)の古墳墳丘部試料および解体後の試料を比較した。各試料の主要な分類群を矢印で示した。

3-2. キトラ古墳の細菌相

キトラ古墳試料の DGGE バンドパターンを図 6 に示した。解析に用いた15試料のうち、天井石および東壁の4試料のバンドパターンは非常に似通っており、主要な細菌として酢酸菌の一種、*Gluconacetobacter* 属が検出された(表 8)。間欠的な UV 照射による微生物対策が実施された後に採取された試料からも *Gluconacetobacter* 属のバンドが検出されたことから、この酢酸菌は石室内の優占種のひとつであったと推察される。酢酸菌については次節でも触れるが、キトラ古墳石室内からは *Gluconacetobacter* 属細菌が石室漆喰の劣化原因微生物の一つとして分離され¹³⁾、分離株の有機酸生成についても報告されている^{48, 49)}。DGGE で得られたバンドの塩基配列は分離株と同じ配列を示していた(表 8)。

キトラ古墳試料からは“*Proteobacteria*”門の細菌が多く検出されているが、特に *Delta-proteobacteria* 綱の粘液細菌と総称されている *Myxococcales* 目細菌に由来するバンドが認められた(表 8)。このグループの細菌は高松塚古墳試料からは非培養法においても検出されず、キトラ古墳試料からも用いた培養法では分離されていない。石室内の UV 照射前には分離結果と同様に様々な分類群の細菌が検出されたが、UV 照射後のバンドパターンには変化が認められ、細菌群集が変化したと考えられる(図 6)。墳丘部土壤では、高松塚古墳土壤試料と同様に、“*Acidobacteria*”・“*Chloroflexi*”・“*Nitrospirae*”各門などの培養困難な細菌群が検出された。盗掘口からの流入土については、墳丘部土壤などと同様なパターンが認められ、漆喰面とは相違がみられた。キトラ古墳石室内試料については非培養法でも DGGE とは異なる手法である、クローニング解析³⁵⁾や NGS による解析³⁶⁾が佐藤らによって実施されている。いずれも UV 照射が開始された後の試料を用いた解析であるが、クローニング解析で認められた *Promicromonospora* 属細菌³⁵⁾については DGGE でも同様に検出され(図 6, 表 8)、また、培養法においても分離株を得ている^{35, 50)}。UV 照射後の微生物相の変化により、このような放線菌の仲間

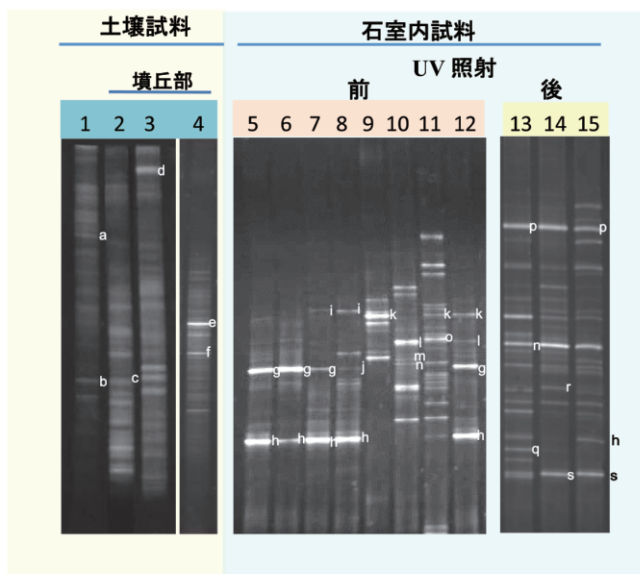


図 6 キトラ古墳試料の16S rRNA 遺伝子増幅産物による DGGE バンドパターン

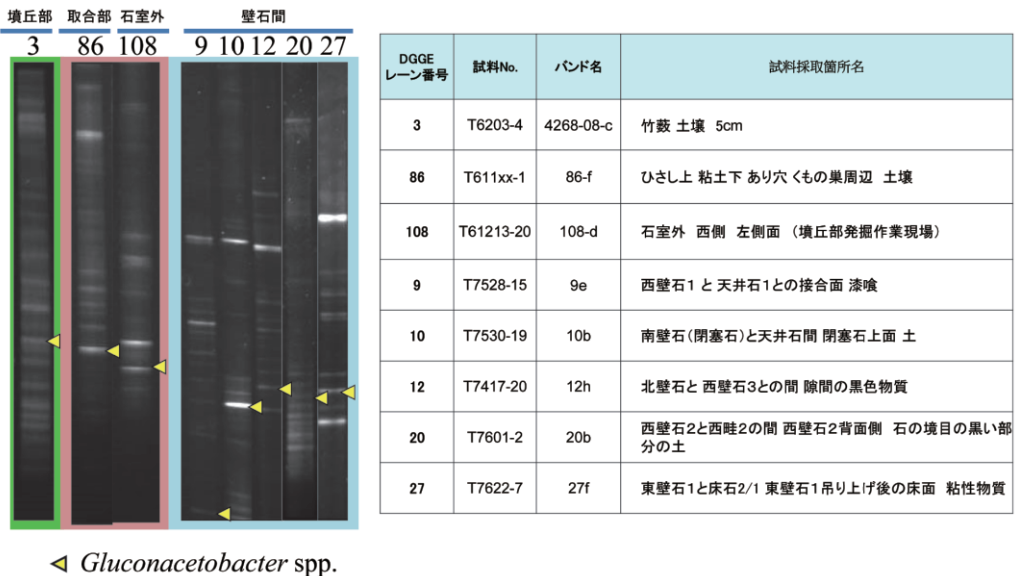
1. 盗掘口からの流入土, 2-4. 墳丘部土壤, 5-12. UV 照射前石室内試料, 13-15. UV 照射後石室内試料 (Sugiyama ら⁷⁾を改変)

アルファベットで示したバンドについては表 8 で BLAST 検索による近縁種を記した。

が優占化したものと推察される。一方、UV 照射前の試料を用いたキトラ古墳菌類相の非培養法による試験は行われなかった。佐藤らによる NGS の解析結果³⁶⁾は同一試料を用いた培養法の結果⁵⁾を概ね支持しており、加えて、培養法では分離されなかった *Beauveria* 属などの菌類が非培養法でのみ検出されている³⁶⁾。このことは、微生物相解析に培養法と非培養法を用いることで、より網羅的な生物相解析が行えることを意味すると考えられる。UV 照射後の菌類相は黒色系（暗色系）の *Cladophialophora*・*Arthrimum*・*Exophiala* 各属などの比較的 UV 耐性を示すような菌類が培養法、非培養法ともに検出されている⁵⁾。細菌についても、UV 照射前の試料では酢酸菌などを含む“*Proteobacteria*”門が多く占めていたが、UV 照射後は“*Bacteroidetes*”門および“*Actinobacteria*”門などが優占種になっており、細菌相の変化が認められた⁷⁾。木川らは UV 照射の効果をあらかじめ調べる目的で、石室内で分離された主要分類群(カビ, 酵母, 細菌)を選抜して UV 耐性試験を行っている⁵¹⁾。暗色系の菌類や放線菌などは比較的 UV 照射に耐性を持つことが示されている⁵²⁾。また、全体として UV 照射後は菌糸状のカビの発生は確認されなくなるなど、マクロの視点から見ると、微生物の活性は抑制されていると推定され⁵⁾、その中で、UV にある程度耐性を示すものが残ったことが検出される細菌割合の違いに反映されたと考えられる。

3-3. 酢酸菌

2005年のキトラ古墳石室内調査において、天井石に 1 cm 程度の小穴があることが認められ、内部にあった黒色粘性のゲル様物質から、*Gluconacetobacter* 属細菌が分離された¹³⁾。加えてキトラ古墳からは DGGE による非培養法を用いた調査でも検出されている(前項)。一方、高松塚古墳石室内の試料からは酢酸菌は分離されなかった。また、4つの石室内試料の DGGE による解析においても酢酸菌に由来するバンドは確認されなかった。その後高松塚古墳の石室が解体され、解体中の試料を用いた DGGE において、酢酸菌に由来すると考えられる配列が検出され



◀ *Gluconacetobacter* spp.

図7 高松塚古墳の酢酸菌由来バンドが検出された試料の16S rRNA 遺伝子増幅産物による DGGE バンドパターン

酢酸菌由来塩基配列が検出されたバンドを矢印で示した。

表7. 高松塚古墳試料から細菌 DGGE により得られた主なバンドの塩基配列による相同性検索結果

試料 カテゴリー	バンド名	近縁種*	近縁配列アク セッション番号	比較塩基数(相同率)	備考
石室内	90-d	<i>Stenotrophomonas tumulicola</i>	NR_148818	194/194(100%)	図4のゲル を参照
石室内	96-c	<i>Stenotrophomonas tumulicola</i>	NR_148818	194/194(100%)	
石室内	96-f	<i>Ochrobactrum</i> sp.	EF377300	169/169 (100.0%)	
石室内	100-c	<i>Ochrobactrum</i> sp.	EF377300	169/169 (100.0%)	
石室内	105-b	<i>Bacillus toyonensis</i>	NR_121761	180/189(95%)	
石室内	105-e	<i>Bordetella tumulicola</i>	NR_145922	190/194(98%)	
取合部	T1-g	<i>Ochrobactrum tritici</i>	AJ242584	169/169 (100.0%)	
壁石間	T33-b	<i>Bacillus simplex</i>	AJ628743	194/194 (100.0%)	
石室外	T9-d	<i>Ochrobactrum tritici</i>	AJ242584	169/169 (100.0%)	
石室外	T11-b	<i>Ochrobactrum tritici</i>	AJ242584	169/169 (100.0%)	
石室外	T28-e	<i>Ochrobactrum tritici</i>	AJ242584	169/169 (100.0%)	
石室外	T31-d	<i>Ochrobactrum tritici</i>	AJ242584	169/169 (100.0%)	
壁石間	T16-b	<i>Stenotrophomonas tumulicola</i>	NR_148818	194/194(100%)	
壁石間	9e	<i>Gluconacetobacter takamatsuzukensis</i>	NR_114384	169/169(100%)	
壁石間	10b	<i>Gluconacetobacter takamatsuzukensis</i>	NR_114384	169/169(100%)	
壁石間	12h	<i>Gluconacetobacter takamatsuzukensis</i>	NR_114384	169/169(100%)	
石室外	20b	<i>Gluconacetobacter takamatsuzukensis</i>	NR_114384	169/169(100%)	
壁石間	27f	<i>Gluconacetobacter takamatsuzukensis</i>	NR_114384	169/169(100%)	
墳丘部1**	4268-08-c	<i>Gluconacetobacter takamatsuzukensis</i>	NR_114384	169/169(100%)	図5のゲル を参照
墳丘部2	647-a	uncultured <i>actinobacterium</i>	EU300567	191/191 (100.0%)	
墳丘部2	649-a	uncultured <i>Acidobacteria</i>	GQ288460	167/169 (98.8%)	
墳丘部2	649-e	uncultured <i>Rhizobiales</i>	AM940802	169/169 (100.0%)	
墳丘部2	662-b	uncultured <i>Chloroflexi</i>	DQ450735	171/171 (100.0%)	
墳丘部2	663-c	uncultured <i>Acidobacteria</i>	EU849214	169/169 (100.0%)	
墳丘部2	669-c	uncultured <i>Acidobacteria</i>	EU849237	169/169 (100.0%)	
墳丘部2	669-e	<i>Streptomyces</i> sp.	GU002065	174/174 (100.0%)	

* : DGGE で得られる配列は短いため、同属別種でも解析領域の配列がほぼ同じである場合は識別ができない。

例えば、*Gluconacetobacter* 属の配列は *G. takamatsuzukensis* 以外の種に対しても100%で一致するものがある。

** : 墳丘部1の試料は図5および図7に掲載

た(図7, 表7)。酢酸菌の分離・培養法は一般的な土壌細菌の分離法とは異なる手法が用いられることから、通常の培養法では見逃してしまうことが考えられた。このことから、集積培養法⁵³⁾を導入して酢酸菌分離を試み、高松塚古墳石室解体中の試料から10株を分離した¹⁴⁾。

キトラ古墳では、当初壁画上のカビ等の防除にパラフォルムアルデヒドのほか、エタノールを用いていた⁵⁾。これは、壁画の顔料と人体への影響が最小限であり、なおかつ防除能の高い薬剤として選択されたものであったが、一部の微生物、特に石室内から分離された *Gluconacetobacter* 属酢酸菌については炭素源として利用されてしまったと考えられる^{13, 48, 49)}。エタノールをイソプロパノールに変更して以降、酢酸菌は分離されなかったが、UV照射開始後の試料を用いた非培養法による解析(DGGE(図6, 表8), クローニング法とNGS)では、同種に由来すると考えられる配列が検出されている^{35, 36)}。特にクローニング法による解析では、分離に用いた試料(*Gluconacetobacter tumulicola* K8617-7-3b 株分離試料)とほぼ同様の箇所から採取された試料から、*G. tumulicola* の配列を示すクローンが得られている³⁵⁾。また、その後

表8. キトラ古墳試料から細菌 DGGE により得られた主なバンドの塩基配列の相同性検索結果

DGGE ゲルレー ン番号 (図7)	試料および採取箇所	バンド名	図6の バンド	バンド配列の帰属分類 群(門/綱)	既知近縁種	相対率 (%)
1	盗掘口からの流入土 2004年 採取	4268-01-b	a	<i>Chloroflexi</i>	<i>Chloroflexi</i>	98.8
		4268-01-c	b	<i>Nitrospirae</i>	<i>Nitrospira</i>	100
2	墳丘東斜面竹藪深さ5cm程度 の土壌	4268-10-b	c	<i>Acidobacteria</i>	<i>Holophaga</i>	96.4
3	墳丘南西畑脇 土壌	4268-12-a	d	<i>Bacteroidetes</i>	<i>Cytophaga</i>	100
4	墳丘部表層の土壌	K8626-49-b	e	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Comamonas</i> sp.	99
		K8626-49-c	f	<i>Firmicutes</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i>	98.3
5	石室内 天井石 北東側隅付近 茶色ゲル	K8617-1-41-a	g	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Beijerinckia mobilis</i>	100
		K8617-1-41-b	h	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	100
6	石室内 東壁 中央上部付近 ゲル(茶褐色)	K8617-2-42-a	g	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Beijerinckia mobilis</i>	100
		K8617-2-42-b	h	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	100
7	石室内 東壁 中央上部付近 白 粒状	K8617-3-43a	i	<i>Bacteroidetes</i>	<i>Olivibacter soli</i>	99.5
		K8617-3-43-b	g	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Beijerinckia mobilis</i>	100
		K8617-3-43-c	h	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	100
8	石室内 天井壁 中心部の亀裂 内2ヶ所 黒色ゲル	K8617-4-44-a	i	<i>Bacteroidetes</i>	<i>Olivibacter soli</i>	99.5
		K8617-4-44-c	j	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Rhizobium</i> sp.	100
		K8617-4-44-e	h	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	100
9	石室内 西壁中央付近 白い粒 状	K8617-5-45-b	k	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Janthinobacterium lividum</i>	99.5
10	石室内 南壁 朱雀取外し跡付 近石材上の赤色	K8617-6-46-c	l	<i>Deltaproteobacteria</i>	<i>Myxococcales</i>	89.1
		K8617-6-46-d	m	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	99.4
		K8617-6-46-e	n	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	99.5
11	石室内 床面 南側 水色	K8617-7-47-f	k	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Janthinobacterium lividum</i>	99.5
		K8617-7-47-h	o	<i>Firmicutes</i>	<i>Bacillus simplex</i>	100
12	石室内 天井壁西側の黒い穴の 内部	K8617-8-48-a	k	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Janthinobacterium</i> sp.	99.5
		K8617-8-48-b	l	<i>Deltaproteobacteria</i>	<i>Myxococcales</i>	89.1
		K8617-8-48-c	g	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Beijerinckia mobilis</i>	100
		K8617-8-48-d	h	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	100
13	石室内 東壁 南側 泥の上 左 黒いゲル(特に黒いもの)	K9403-1-a	p	<i>Bacteroidetes</i>	<i>Flavobacterium johnsoniae</i>	98.9
		K9403-1-d	n	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i>	100
		K9403-1-g	q	<i>Deltaproteobacteria</i>	<i>Cystobacter</i> sp.	99.5
14	石室内 東壁 南側 泥の上 黒色 ゲル	K9403-2-c	r	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Rhizobium</i> sp.	100
		K9403-2-d	s	<i>Actinobacteria</i>	<i>Promicromonospora</i> sp.	100
15	石室内 東壁 南側 下方 石の面 の上 ゲル	K9403-3-a	p	<i>Bacteroidetes</i>	<i>Flavobacterium chungangense</i>	98.9
		K9403-3-b	h	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	100
		K9403-3-c	s	<i>Actinobacteria</i>	<i>Promicromonospora</i> sp.	99.4

の NGS 解析においても用いた8つのうち4つの試料から酢酸菌由来の配列がわずかに検出されている³⁶⁾。さらに、これら4つのサンプル³⁶⁾は東壁、天井(北側と西側)、西壁からのものであること、本稿で用いた酢酸菌由来のバンドが検出された UV 照射後の DGGE サンプルは床面のサンプルであることから、酢酸菌は石室内に広く分布していた可能性が示唆される。酢酸菌のような微生物が有機酸を生成することで、漆喰面の pH が低下するとともに、生成された有機酸は他の微生物にとって栄養塩として利用されたことが漆喰面の劣化原因の一つとして考えられている^{7, 48, 49)}。

なお、高松塚古墳試料からの酢酸菌分離のように、先に DGGE を行い、その結果から壁画の生物劣化に関与する新種の細菌が分離されている例が Heyrman・Swings によって報告されている⁵⁴⁾。非培養法で検出された優占微生物に対して有効な培養法を採用し、劣化原因微生物を分離してその後の防除対策に役立てることが可能となると考える。

4. おわりに

非培養法による文化財(遺跡)等の劣化原因微生物の解明は特に、ヨーロッパを中心に報告

例が多い。中でも、スペインのアルタミラなどの洞窟壁画^{26, 28)}やフランスのラスコー^{29, 30)}、イタリア・ネクロポリスの遺跡^{32, 33)}などで DGGE, クローニング法による解析が行われている。加えて、これらの報告では、劣化原因微生物の解明を壁画等の保存、被害の緩和のために役立てることを目的とし、培養法と非培養法を併用して調査しているものが多い。我々の試験でも、両手法を併用して行い、分離株からは防除用薬剤の効果⁵⁵⁾あるいは薬剤および資材の資化性⁵⁶⁻⁵⁸⁾、有機酸等の生成^{48, 49)}、UV 耐性^{51, 52)}など、保存や緩和に役立てる試験が行われている。また、培養困難な微生物、あるいは培養法による選択圧の回避をする意味では、遺伝子レベルで解析する非培養法は非常に有効なツールとなった。特に、当初用いていた一般的な培養方法では分離されなかったが、非培養法で検出された酢酸菌に対して、培養手法を変更することで、解体途中の試料から分離することができた。DGGE を用いたこれまでの報告では、培養法と非培養法で検出される微生物相は必ずしも一致していないといわれている²⁴⁻²⁸⁾。高松塚古墳壁画の生物劣化原因究明のために実施した培養法と非培養法の結果、菌類および細菌ともに優占種として検出された微生物は両手法でおおむね一致していた。特に菌類では Eurotiales・Hypocreales・Chaetothyriales・Helotiales・Saccharomycetales 各目などの子囊菌門が多く検出され、培養法による結果とよく一致していた。一方、非培養法を用いたことで、細菌については現時点では培養困難な種が多いとされる、“*Acidobacteria*” 門および “*Chloroflexi*” 門などが検出された。“*Acidobacteria*” 門の細菌についてはスペインの洞窟壁画からも優占種として検出されており、高松塚古墳やキトラ古墳の試料から得られた DGGE バンドの中にはスペインの三か所の洞窟壁画から得られた配列³¹⁾と一致するものも認められた⁷⁾。一方で、菌類では非培養法においても、DGGE とクローニング法で検出される分類群に違いが認められた。例えば Hypocreales 目は培養法や DGGE では分離・検出されたがクローニング法では検出されなかった。一方、墳丘部土壌からは Xylariales 目が DGGE で、Pleosporales 目がクローニング法で検出されている。これらのことから、より詳細で正確な生物相の把握のためには培養法、非培養法の併用および非培養法でも異なる手法の併用などを行うことが望ましい⁷⁾。

また、高松塚古墳試料からは 18S 塩基配列領域を増幅した際に遺伝子レベルでもトビムシに由来する塩基配列が検出された。石室内からはトビムシなど節足動物の死骸等が見出されていたが、目視レベルで認識されるよりも多くこれらが生息していた可能性を示唆するものと考えられる。これらの節足動物は、石室外部からの微生物侵入や石室内での伝搬に運び屋 (Vector) としての役割を果たしたと考えられるほか、微生物が増殖するための栄養に乏しい環境と考えられる石室内において、死骸として微生物の栄養供給源となるなどの役割を果たしたことが考えられる。

謝 辞

本研究は、JSPS 科学研究費・基盤研究 (A) 課題番号 19200057 (平成19年度~22年度) 「高松塚古墳壁画劣化要因微生物の遺伝・表現形質等基礎データ (研究代表者: 佐野千絵)」ならびに財団法人発酵研究所研究助成 (平成20年度~22年度) 「文化財の生物劣化にかかわる菌類分子群集解析および DNA バーコードの実用化 (研究代表者: 安 光得)」の助成を受けて遂行した。ここに記して謝意を表す。

参考文献

- 1) 古墳壁画の保存活用に関する検討会：高松塚古墳の保存管理の経緯と壁画修理後の当分の間の

保存の在り方について 平成26年3月27日 文化庁ホームページ

http://www.bunka.go.jp/seisaku/bunkazai/takamatsu_kitora/pdf/takamatsuzuka_shiryo.pdf

- 2) 高松塚古墳壁画劣化原因調査検討会：高松塚古墳壁画劣化原因調査報告書. 106 pp. 文化庁 (2010)
- 3) 独立行政法人国立文化財機構奈良文化財研究所、文化庁 (編)：国宝高松塚古墳壁画恒久保存対策事業報告書 1 特別史跡高松塚古墳発掘調査報告—高松塚古墳石室解体事業にともなう発掘調査—(本文+付図)、文化庁、独立行政法人国立文化財機構奈良文化財研究所、奈良県橿原考古学研究所、明日香村教育委員会 (2017)
- 4) Kigawa, R., Sano, C., Ishizaki, T., Miura, S., Sugiyama J.: Biological issues in the conservation of mural paintings of Takamatsuzuka and Kitora tumuli in Japan. *In: Study of Environmental Conditions Surrounding Cultural Properties and Their Protective Measures: Proceedings of The 31st International Symposium on the Conservation and Restoration of Cultural Property* (ed. by Sano, C.), pp. 43-50, National Research Institute for Cultural Properties, Tokyo (2009)
- 5) 木川りか、喜友名朝彦、立里臨、佐藤嘉則、佐野千絵、杉山純多：キトラ古墳の微生物調査報告 (2012年~2013年) および2004年から2013年までの微生物調査結果概要、保存科学、54、83-109 (2015)
- 6) Sugiyama, J., Kiyuna, T., An, K.-D., Nagatsuka, Y., Handa, Y., Tazato, N., Hata, J., Nishijima, M., Koide, T., Yaguchi, Y., Kigawa, R., Sano, C., Miura, S.: Microbiological survey of the stone chambers of Takamatsuzuka and Kitora Tumuli, Nara Prefecture, Japan: a milestone in elucidating the cause of biodeterioration of mural paintings. *In: Study of Environmental Conditions Surrounding Cultural Properties and Their Protective Measures: Proceedings of The 31st International Symposium on the Conservation and Restoration of Cultural Property* (ed. by Sano, C.), pp. 51-73, National Research Institute for Cultural Properties, Tokyo (2009)
- 7) Sugiyama, J., Kiyuna, T., Nishijima, M., An, K.-D., Nagatsuka, Y., Tazato, N., Handa, Y., Hata-Tomita, J., Sato, Y., Kigawa, R., Sano, C.: Polyphasic insights into the microbiomes of the Takamatsuzuka Tumulus and Kitora Tumulus, *The Journal of General and Applied Microbiology*, 63, 63-113 (2017)
- 8) Kiyuna, T., An, K.-D., Kigawa, R., Sano, C., Miura, S., Sugiyama, J.: Mycobiota of the Takamatsuzuka and Kitora tumuli in Japan, focusing on the molecular phylogenetic diversity of *Fusarium* and *Trichoderma*, *Mycoscience*, 49, 298-311 (2008)
- 9) An, K.-D., Kiyuna, T., Kigawa, R., Sano, C., Miura, S., Sugiyama, J.: The identity of *Penicillium* sp. 1, a major contaminant of the stone chambers in the Takamatsuzuka and Kitora Tumuli in Japan, is *Penicillium paneum*, *Antonie van Leeuwenhoek*, 96, 579-592 (2009)
- 10) Nagatsuka, Y., Kiyuna, T., Kigawa, R., Sano, C., Miura, S., Sugiyama, J.: *Candida tumulicola* sp. nov. and *Candida takamatsuzukensis* sp. nov., novel yeast species assignable to the *Candida membranifaciens* clade, isolated from the stone chamber of the Takamatsuzuka tumulus, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59, 186-194 (2009)
- 11) Kiyuna, T., An, K.-D., Kigawa, R., Sano, C., Miura, S., Sugiyama, J.: Molecular assessment

- of fungi in “black spots” that deface murals in the Takamatsuzuka and Kitora Tumuli in Japan: *Acremonium* sect. *Gliomastix* including *Acremonium tumulicola* sp. nov. and *Acremonium felinum* comb. nov., *Mycoscience*, 52, 1-17 (2011)
- 12) Kiyuna, T., An, K.-D., Kigawa, R., Sano, C., Miura, S., Sugiyama, J.: Bristle-like fungal colonizers on the stone walls of the Kitora and Takamatsuzuka Tumuli are identified as *Kendrickiella phycomyces*, *Mycoscience*, 53, 446-459 (2012)
- 13) Tazato, N., Nishijima, M., Handa, Y., Kigawa, R., Sano, C., Sugiyama, J.: *Gluconacetobacter tumulicola* sp. nov. and *Gluconacetobacter asukensis* sp. nov., isolated from the stone chamber interior of the Kitora Tumulus, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 62, 2032-2038 (2012)
- 14) Nishijima, M., Tazato, N., Handa, Y., Tomita, J., Kigawa, R., Sano, C., Sugiyama, J.: *Gluconacetobacter tumulisoli* sp. nov., *Gluconacetobacter takamatsuzukensis* sp. nov. and *Gluconacetobacter aggeris* sp. nov., isolated from Takamatsuzuka Tumulus samples before and during the dismantling work in 2007, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63, 3981-3988 (2013)
- 15) Kiyuna, T., An, K.-D., Kigawa, R., Sano, C., Miura, S., Sugiyama, J.: “Black particles”, the major colonizers on the ceiling stone of the stone chamber interior of the Kitora Tumulus, Japan, are the bulbiferous basidiomycete fungus *Burgoa anomala*, *Mycoscience*, 56, 293-300 (2015)
- 16) Tazato, N., Handa, Y., Nishijima, M., Kigawa, R., Sano, C., Sugiyama, J.: Novel environmental species isolated from the plaster wall surface of mural paintings in the Takamatsuzuka tumulus: *Bordetella muralis* sp. nov., *Bordetella tumulicola* sp. nov. and *Bordetella tumbae* sp. nov., *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 65, 4830-4838 (2015)
- 17) Handa, Y., Tazato, N., Nagatsuka, Y., Koide, T., Kigawa, R., Sano, C., Sugiyama, J.: *Stenotrophomonas tumulicola* sp. nov. , a major contaminant of the stone chamber interior in the Takamatsuzuka Tumulus, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 66, 1119-1124 (2016)
- 18) Nagatsuka, Y., Ninomiya, S., Kiyuna, T., Kigawa, R., Sano, C., Sugiyama, J.: *Yamadazyma kitorensis* f.a., sp. nov. and *Zygoascus biomembranicola* f.a., sp. nov., novel yeasts from the stone chamber interior of the Kitora Tumulus, and five novel combinations in *Yamadazyma* and *Zygoascus* for species of *Candida*, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 66, 1692-1704 (2016)
- 19) 半田豊、立里臨、佐藤嘉則、木川りか、佐野千絵、杉山純多：高松塚・キトラ両古墳からの主要細菌分離株：*Bacillus*・*Ochrobactrum* 両属分離株の分子系統学的位置、保存科学、56、33-48 (2017)
- 20) Nagatsuka, Y., Kiyuna, T., Kigawa, R., Sano, C., Sugiyama, J.: *Prototheca tumulicola* sp. nov., a novel achlorophyllous, yeast-like microalga isolated from the stone chamber interior of the Takamatsuzuka Tumulus, *Mycoscience*, 58, 53-59 (2017)
- 21) Nishijima, M., Tazato, N., Handa, Y., Umekawa, N., Kigawa, R., Sano, C., Sugiyama, J.: *Krasilnikoviella muralis* gen. nov., sp. nov. , a new member of the family *Promicromonosporaceae*, isolated from the Takamatsuzuka Tumulus stone chamber interior and reclassification

- of *Promicromonospora flava* as *Krasilnikoviella flava* comb. nov., International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 67, 294-300 (2017)
- 22) Nishijima, M., Tazato, N., Handa, Y., Umekawa, N., Kigawa, R., Sano, C., Sugiyama, J.: *Microbacterium tumbae* sp. nov., an actinobacterium isolated from the stone chamber of ancient tumulus, International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 67, 1777-1783 (2017)
- 23) 石井浩介、中川達功、福井学：技法シリーズ。微生物生態学への変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法の応用、日本微生物生態学会誌、15、59-73 (2000)
- 24) Gurtner, C., Heyrman, J., Piñar, G., Lubitz, W., Swings, J., Rölleke, S.: Comparative analyses of the bacterial diversity on two different biodeteriorated wall paintings by DGGE and 16S rDNA sequence analysis, International Biodeterioration and Biodegradation, 46, 229-239 (2000)
- 25) Schabereiter-Gurtner, C., Saiz-Jiménez, C., Piñar, G., Lubitz, W., Rölleke, S.: Phylogenetic 16S rRNA analysis reveals the presence of complex and partly unknown bacterial communities in Tito Bustillo cave, Spain, and on its Palaeolithic paintings, Environmental Microbiology, 4, 392-400 (2002)
- 26) Schabereiter-Gurtner, C., Saiz-Jiménez, C., Piñar, G., Lubitz, W., Rölleke, S.: Altamira cave Paleolithic paintings harbor partly unknown bacterial communities, FEMS Microbiology Letters, 211, 7-11 (2002)
- 27) Schabereiter-Gurtner, C., Saiz-Jiménez, C., Piñar, G., Lubitz, W., Rölleke, S.: Phylogenetic diversity of bacteria associated with Paleolithic paintings and surrounding rock walls in two Spanish caves (Llonín and La Garma), FEMS Microbiology Ecology, 47, 235-247 (2004)
- 28) Portillo, M. C., Gonzalez, J. M., Saiz-Jimenez, C.: Metabolically active microbial communities of yellow and grey colonizations on the walls of Altamira Cave, Spain, Journal of Applied Microbiology, 104, 681-691 (2008)
- 29) Bastian, F., Alabouvette, C., Jurado, V., Saiz-Jimenez, C.: Impact of biocide treatments on the bacterial communities of the Lascaux Cave, Naturwissenschaften, 96, 863-868 (2009)
- 30) Martin-Sanchez, P. M., and Saiz-Jimenez, C.: Contribution of culture-independent methods to cave aerobiology: the case of Lascaux Cave. *In*: The conservation of subterranean cultural heritage, ed. by Saiz-Jimenez, C. Taylor & Francis group, London. pp. 215-222 (2014)
- 31) Schabereiter-Gurtner, C., Piñar, G., Lubitz, W., Rölleke, S.: *Acidobacteria* in Paleolithic painting caves, *In*: Molecular Biology and Cultural Heritage, Saiz-Jimenez (ed.) Swets & Zeitlinger, Lisse, pp. 15-21 (2003)
- 32) Diaz-Herraiz, M., Jurado, V., Cuezva, S., Laiz, L., Pallecchi, P., Tiano, P., Sanchez-Moral S., Saiz-Jimenez, C.: The Actinobacterial colonization of Etruscan paintings. Scientific Reports, 3, 1440 [doi:10.1038/srep01440] (2013)
- 33) Diaz-Herraiz, M., Jurado, V., Cuezva, S., Laiz, L., Pallecchi, P., Tiano, P., Sanchez-Moral, S., Saiz-Jimenez, C.: Deterioration of an Etruscan tomb by bacteria from the order *Rhizobiales*, Scientific Reports, 4, 3610 [doi: 10.1038/srep03610] (2014)
- 34) Ma, Y., Zhang, H., Du, Y., Tian, T., Xiang, T., Liu, X., Wu, F., An, L., Wang, W., Gu, J.-D., Feng, H.: The community distribution of bacteria and fungi on an ancient wall paintings of the Mogao Grottoes, Scientific Reports, 5: 7752, Doi: 10.1038/srep07752 (2015)

- 35) 佐藤嘉則、木川りか、喜友名朝彦、立里臨、西島美由紀、杉山純多：非培養法によるキトラ古墳の細菌調査、保存科学、52、1-10 (2013)
- 36) 佐藤嘉則、木川りか、喜友名朝彦、立里臨、西島美由紀、杉山純多：パイロシークエンス法によるキトラ古墳石室内の微生物群集構造解析、保存科学、54、111-120 (2015)
- 37) Muyzer, G., de Waal, E. C., Uitterlinden, A. G.: Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA, Applied and Environmental Microbiology, 59, 695-700 (1993)
- 38) Van Hannen, E. J., van Agterveld, M. P., Gons, H. J., Laanbroek, H. J.: Revealing eukaryotic genetic diversity in aquatic environments by denaturing gradient gel electrophoresis, Journal of Phycology, 34, 206-213 (1998)
- 39) May, L. A., Smiley, B., Schmidt, M. G.: Comparative denaturing gradient gel electrophoresis analysis of fungal communities associated with whole plant corn silage, Canadian Journal of Microbiology, 47, 829-841 (2001)
- 40) Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D. J.: Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs, Nucleic Acids Research, 25, 3389-3402 (1997)
- 41) Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., Kumar, S.: MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0., Molecular Biology and Evolution, 24, 1596-1599 (2007)
- 42) Kirk P. M., Cannon P. F., Minter D. W. & Stalpers J. A.: Dictionary of the Fungi 10th Edition, CAB International, Wallingford, 771 pp. (2008).
- 43) Dromph, K. M.: Collembolans as vectors of entomopathogenic fungi, Pedobiologia, 47, 245-256 (2003)
- 44) Greif, M. D., Currah, R. S.: Patterns in the occurrence of saprophytic fungi carried by arthropods caught in traps baited with rotted wood and dung, Mycologia, 99, 7-19 (2007)
- 45) Bastian, F., Alabouvette, C., Saiz-Jimenez, C.: The impact of arthropods on fungal community structure in Lascaux cave, Journal of Applied Microbiology, 106, 1456-1462 (2009)
- 46) Bastian, F., Jurado, V., Nováková, A., Alabouvette, C., Saiz-Jimenez, C.: The microbiology of Lascaux cave, Microbiology, 156, 644-652 (2010)
- 47) Hoffmann, A., Thimm, T., Dröge, M., Moore, E. R. B., Munch, J. C., Tebbe, C. C.: Intergeneric transfer of conjugative and mobilizable plasmids harbored by *Escherichia coli* in the gut of the soil microarthropod *Folsomia candida* (Collembola), Applied and Environmental Microbiology, 64, 2652-2659 (1998)
- 48) 佐野千絵、西島美由紀、喜友名朝彦、木川りか、杉山純多：高松塚古墳石室内より分離された主要な微生物のギ酸・酢酸生成能、保存科学、49、209-219 (2010)
- 49) Kigawa, R., Sano, C., Nishijima, M., Tazato, N., Kiyuna, T., Hayakawa, N., Kawanobe, W., Udagawa, S., Tateishi, T., Sugiyama, J.: Investigation of acetic acid bacteria isolated from the Kitora tumulus in Japan and their involvement in the deterioration of the plaster of the mural paintings, Studies in Conservation, 52, 30-40 (2013)
- 50) 木川りか、佐藤嘉則、喜友名朝彦、立里臨、杉山純多、早川典子、川野邊渉：キトラ古墳の微生物調査報告 (2011)、保存科学、51、167-171 (2012)
- 51) 木川りか、佐野千絵、喜友名朝彦、立里臨、杉山純多、高島浩介、久米田裕子、森井順之、早川

- 典子、川野邊渉：キトラ古墳の微生物調査結果と微生物対策について（2009）、保存科学、49、253-264（2010）
- 52) 木川りか、喜友名朝彦、立里臨、佐藤嘉則、杉山純多：キトラ古墳から分離された微生物の紫外線（UV）照射試験結果について、保存科学、52、157-166（2013）
- 53) 山田雄三：酢酸菌、*In*：微生物の分離法、山里一英、宇田川俊一他編、R&Dプランニング、東京、pp. 454-457（1986）
- 54) Heyrman J., Swings J. Description of novel bacterial species associated with biodeteriorated mural paintings using molecular techniques. *In*: Molecular Biology and Cultural Heritage, Saiz-Jimenez, C. (ed.), A. A. Balkema Publishers, Lisse, pp. 29-34（2003）
- 55) 木川りか、佐野千絵、立里臨、喜友名朝彦、小出知己、杉山純多：キトラ古墳のバイオフィームから分離されたバクテリア・菌類に対するケーソン CG 相当品（抗菌剤）の効果、保存科学、46、39-50（2007）
- 56) 木川りか、佐野千絵、喜友名朝彦、立里臨、杉山純多：高松塚古墳・キトラ古墳石室内の微生物分離株のアルコール系殺菌剤資化性試験、保存科学、49、231-238（2010）
- 57) 木川りか、佐野千絵、高鳥浩介、喜友名朝彦、杉山純多、安部倫子、中右恵理子、坪倉早智子、早川典子、川野邊渉、石崎武志：高松塚古墳石室内・取合部および養生等で使用された樹脂等材料のかび抵抗性試験、保存科学、49、61-71（2010）
- 58) 木川りか、佐野千絵、喜友名朝彦、立里臨、杉山純多、早川典子、川野邊渉：キトラ古墳から分離された細菌や酵母の修復用高分子材料に対する資化性試験、保存科学、51、157-166（2011）

キーワード：高松塚古墳（Takamatsuzuka Tumulus）；キトラ古墳（Kitora Tumulus）；微生物群集構造解析（microbial community analysis）；非培養法（culture-independent method）；変性剤濃度勾配電気泳動（DGGE）；クローニング（cloning）

Microbial Community Analyses of the Takamatsuzuka and Kitora Tumuli Using Molecular Methods

Miyuki NISHIJIMA*, Kwang-Deuk An*¹, Junko TOMITA*, Tomohiko KIIYUNA*, Yoshinori SATO, Rika KIGAWA², Chie SANNO, Shigemasa UDAGAWA**, Toru TATEISHI**, and Junta SUGIYAMA***³

Culture-dependent and -independent methods were applied to elucidate the microbiota involved in the biodeterioration of the 1300-year-old mural paintings, plaster walls, and stone chamber interiors of the Takamatsuzuka and Kitora Tumuli. Most isolated microorganisms were also detected as major by PCR-DGGE; however, several bacteria such as the phyla “*Acidobacteria*”, “*Chloroflexi*”, and “*Cyanobacteria*” were detected only via a culture-independent method (PCR-DGGE). Based on the results of this study, it was presumed that the microorganisms, such as bacteria and fungi, and mites and collembolans living in the tumulus environment invaded the stone chamber interiors of both tumuli. Moreover, it was thought that the organic acids (particularly acetic acid) produced from the microorganisms (e.g., *Gluconacetobacter* bacteria) not only damaged the plaster directly, but also provided nutrients to other microorganisms and enhanced their outbreaks. Major colonizers of the stone chamber interiors were assignable to ubiquitous microorganisms living in the Asuka-mura environment where both tumuli are located. To detect diverse microbiota in the tumulus samples, it was effective to use microbial community analysis using molecular methods combined with conventional isolation and cultivation methods.

*TechnoSuruga Laboratory Co., Ltd. **Agency for Cultural Affairs

***TechnoSuruga Laboratory Co., Ltd., Chiba Branch Office

¹Present affiliation: Macrogen Japan Corp. ²Present affiliation: Kyushu National Museum

³Present affiliation: National Museum of Nature and Science